

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΑΛΙΕΙΑΣ & ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ  
(πρώην Τμήμα Τεχνολογίας Αλιείας –Υδατοκαλλιέργειών)

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



# ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ (RFLP) ΚΑΙ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ *Pagrus Sp.* ΣΕ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΩΝ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΥΔΑΤΩΝ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΣΠΟΥΔΑΣΤΩΝ: ΣΜΑΝΗΣ ΜΑΡΙΟΣ - ΜΑΚΡΗΣ ΑΧΙΛΛΕΑΣ  
ΕΠΟΠΤΕΥΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: κ. ΜΠΑΤΑΡΓΙΑΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ – ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΙΕΡΑΣ ΠΟΛΕΩΣ ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ 2020

## **ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

**Μπαταργιάς Κωνσταντίνος**<sup>1,2</sup>, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Ζ.Π.Α.Υ., Πανεπιστήμιο Πατρών

**Κατσέλης Γεώργιος**, Καθηγητής Τμήματος Ζ.Π.Α.Υ., Πανεπιστήμιο Πατρών

**Κλαδάς Ιωάννης**, Καθηγητής Τμήματος Ζ.Π.Α.Υ., Πανεπιστήμιο Πατρών

---

<sup>1</sup>Επιβλέπων Καθηγητής

<sup>2</sup>Μέλη της εξεταστικής επιτροπής

---

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γενετική ταυτοποίηση ιχθύων φαγκρί αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την κατανόηση της διασποράς αυτών, στα ελληνικά ύδατα. Δύο περιοριστικά ένζυμα (RFLP) χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση φαγκριών. Τα θραύσματα των ζωνών των δειγμάτων παρέπεμψαν στην ταυτοποίηση των ειδών φαγκρί *Pagrus pagrus*, *Dentex gibbosus* και *Pagrus major*. Το είδος *Pagrus major* παρατηρήθηκε στο φυσικό περιβάλλον στην περιοχή της Μακύνειας Αιτωλοακαρνανίας.

## ABSTRACT

The genetic identification of red sea bream is a useful tool for understanding their dispersion in Greek waters. Two restriction enzymes (RFLPs) were used to identify red sea bream. The fragments of the specimen bands referred to the identification of the species of *Pagrus pagrus*, *Dentex gibbosus* and *Pagrus major*. The species *Pagrus major* was observed in the natural environment in the region of Makinea Aitolokarnania.

## **-ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ-**

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	2
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	4 - 5
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	6 - 8
I. Δειγματοληψίες.....	6
II. Απομόνωση DNA με προσθήκη NaCl υψηλής περιεκτικότητας.....	7
III. Ενίσχυση τμημάτων μιτοχονδριακού DNA (γονιδίου mtCOI) με την χρήση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης – PCR και ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης.....	7
IV. Πέψη PCR – προϊόντων με το περιοριστικό ένζυμο Taq I και ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης.....	8
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	9 - 19
I. Βιοπληροφορική ανάλυση.....	9
II. Πολυμορφισμός μήκους θραύσματος περιορισμού (RFLP) σε κάθε δείγμα.....	10 - 19
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	20
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	21 - 22

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το είδος *Pagrus major* αναφέρεται και ως *Pagrus auratus major*, ως υποείδος του *Pagrus auratus*, παρατηρούμενο στις θάλασσες του βορειοδυτικού ατλαντικού ωκεανού (Dulcic and Kraljevic 2007). Ειδικότερα στην Ιαπωνία γίνεται καλλιέργεια του *Pagrus major* πάνω από 60 χρόνια (Foscarini R. 1988). Στην Μεσόγειο το 2004, παρόλο που δεν είχε γίνει αναφορά του συγκεκριμένου είδους στο φυσικό περιβάλλον άλλης περιοχής εκτός του Ατλαντικού ωκεανού, ένα άτομο παρατηρείται στην περιοχή της Αδριατικής θάλασσας (Dulcic and Kraljevic 2007). Συγκριτικά με τα είδη των ελληνικών θαλασσών, το είδος αυτό (*Pagrus major*) είναι δύσκολο να διαχωριστεί φαινοτυπικά (Nakado 2002) παρά μόνο γενετικά.

Παραδοσιακές μοριακές τεχνικές εξελίχθηκαν τις τελευταίες δύο δεκαετίες προσφέροντας αξιόπιστες και αποτελεσματικές μεθόδους (Girish et al. 2005) συμπεριλαμβανομένων της αλυσιδωτής αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) (Rodriguez et al. 1991) και της μεθόδου πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού (RFLP) με περιοριστικά ένζυμα (Wang et al. 2010). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι η μέθοδος που έφερε πραγματική επανάσταση στη μοριακή βιολογία από την ανακάλυψή της το 1983. Η PCR είναι ένας απλός τρόπος πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων τμημάτων του αρχικού γενετικού υλικού, έτσι ώστε να είναι εφικτή η περαιτέρω μελέτη του με διάφορες μεθόδους, όπως η αλληλούχηση, η πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η ηλεκτροφόρηση κ.ά. Η ταχύτητα, η ειδικότητα, η μεγάλη ευαισθησία και το χαμηλό της κόστος την έχουν κάνει μια από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους σε ερευνητικό και διαγνωστικό επίπεδο. Η αντίδραση εκτελείται σε τρία επαναλαμβανόμενα στάδια: (α) αποδιάταξη του γενετικού υλικού, (β) υβριδισμός των εκκινητών στη συμπληρωματική τους αλληλουχία του DNA και (γ) επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA (Pfaffl Michael W. 2004). Η μέθοδος PCR αποτελεί πλέον ένα εύκολο, γρήγορο, αξιόπιστο και αποτελεσματικό εργαλείο για την ταυτοποίηση πολλών ειδών ζωικών οργανισμών τα τελευταία χρόνια, επικρατώντας στο χώρο της Γενετικής ως μια εναλλακτική και πολλά υποσχόμενη μέθοδο, αντικαθιστώντας τις προηγούμενες (Kesmen et al. 2010, Mafu et al. 2009).

Η τεχνική PCR-RFLP είναι αρκετά δημοφιλής και εφαρμόζεται στη βιολογία, την ιατρική και την επιστήμη των τροφίμων (Kurihara A. et al 1999). Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες (περιοριστικά ένζυμα) είναι ένζυμα βακτηριακής προέλευσης που έχουν τη δυνατότητα να διασπών το δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, αφού αναγνωρίσουν μικρού μεγέθους χαρακτηριστικές αλληλουχίες. Για τον λόγο αυτό παρομοιάζονται με «μοριακά ψαλίδια». Η φυσιολογική λειτουργία των περιοριστικών ενδονουκλεασών είναι η προστασία των βακτηρίων από παθογόνους οργανισμούς, κυρίως βακτηριοφάγους. Η ανακάλυψή τους από τον Werner Arber το 1965 έφερε επανάσταση στη μοριακή βιολογία επιτρέποντας την ανάπτυξη των τεχνικών του ανασυνδυασμένου DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιούνται ευρέως στο εργαστήριο αν και η ανάπτυξη νέων μεθόδων έχει υποκαταστήσει τη χρήση τους σε ορισμένες περιπτώσεις. Η μελέτη πολυμορφισμών μήκους θραυσμάτων περιοριστικών ενδονουκλεασών (RFLPs) αποτελεί μια από την εφαρμογή τους (Arber 1965). Η μέθοδος απαιτεί την ενίσχυση του υπό μελέτη τμήματος του DNA με PCR και στη συνέχεια την επώαση του προϊόντος της αντίδρασης σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας με την περιοριστική ενδονουκλεάση. Μετά την πέψη του προϊόντος ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης και αναγνώριση των χαρακτηριστικών θραυσμάτων του DNA.

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού, κατά την οποία φορτισμένα μόρια (π.χ. πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα) μετακινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου στο

εσωτερικό πηκτών ή διαλυμάτων. Διαφορετικά μόρια κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες και τα συστατικά ενός μίγματος διαχωρίζονται εάν βρεθούν μέσα σε κατάλληλο ηλεκτρικό πεδίο (Καρκαλούσος Π. 2012).

Βασιζόμενοι στην μέθοδο PCR, ερευνητές προτείνουν ότι η ανάλυση της ποικιλομορφίας της αλληλουχίας της οξειδάσης c του κυτοχρώματος της υπομονάδας I (COI), όπου αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα του ενζύμου και την μεγαλύτερη από τις τρεις του συμπλόκου (Li et al. 2006), του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) οδηγεί σε ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την διάγνωση των ειδών του ζωικού βασιλείου. Γεγονός, είναι ότι υποστηρίζουν πως η ποικιλομορφία της αλληλουχίας του γονιδίου αυτού (mtCOI) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία και την κατασκευή συστημάτων «barcoding», τα οποία επιτρέπουν την ταυτοποίηση όλων των ζωικών οργανισμών (Hebert, deWaard and Landry 2010). Οι περισσότεροι ευκαρυώτες δεν έχουν περιγραφεί και η είσοδος ενός είδους στο σύστημα του Linnaeus δεν καταφέρνει να εξασφαλίσει την αναγνώριση και διαχωρισμό πολλών ειδών, επειδή πολλοί ιδιαίτεροι μορφολογικοί χαρακτήρες που διαχωρίζουν στενά συγγενικά είδη απαιτούν την ύπαρξη τόσο ολόκληρων των οργανισμών όσο και την παρουσία εμπειρογνομόνων. Ο πολυμορφισμός των αλληλουχιών και οι τυποποιημένες γονδιακές περιοχές (DNA barcodes) παρέχουν μια εναλλακτική προσέγγιση τόσο για την αναγνώριση γνωστών ειδών όσο και για την ανακάλυψη νέων (Hebert, et al. 2010). Παράλληλα βοηθούν στην αντιμετώπιση της λανθασμένης σήμανσης αλιευτικών προϊόντων, η οποία λειτουργεί παραπλανητικά παγκοσμίως, δίνοντας την δυνατότητα για ταυτοποίηση σε μοριακό επίπεδο καθώς και πλήρη διαφάνεια για τους καταναλωτές όσον αφορά τα ασφαλή τρόφιμα και την ακριβή και ειλικρινή πληροφόρηση (Di Pinto et al. 2015).

Όσον αφορά, την βιοπληροφορική ανάλυση, η ψηφιακή γλώσσα που χρησιμοποιείται από τους υπολογιστές για αποθήκευση και επεξεργασία πληροφορίας είναι ιδανική για τον χειρισμό του ψηφιακού κώδικα που υπάρχει φυσιολογικά στα γονιδιώματα, με την λογική ότι κάθε μονάδα ζεύγους βάσεων της αλληλουχίας του DNA παίρνει μόνο τέσσερις πιθανές τιμές στην μια αλυσίδα. Δηλαδή, θυμίνη, αδερίνη, γουανίνη ή κυτοσίνη, που σχηματίζουν ζεύγη με μια συμπληρωματική βάση στην δεύτερη αλυσίδα. Οι τέσσερις αυτές τιμές μπορούν να εκπροσωπούνται από δύο ψηφία του δυαδικού κώδικα που χρησιμοποιούν οι υπολογιστές (00, 01, 10 και 11). Αυτό το γεγονός είχε ως αποτέλεσμα να παράγονται μεγάλοι όγκοι δεδομένων, τις οποίες διοχέτευαν σε βάσεις δεδομένων. Οι αλληλουχίες κατατίθενται ηλεκτρονικά και οποιοσδήποτε στον κόσμο, έχοντας διαδικτυακά σύνδεση, μπορεί να τις κατεβάσει και να τις αναλύσει (Hartwell et al 2011).

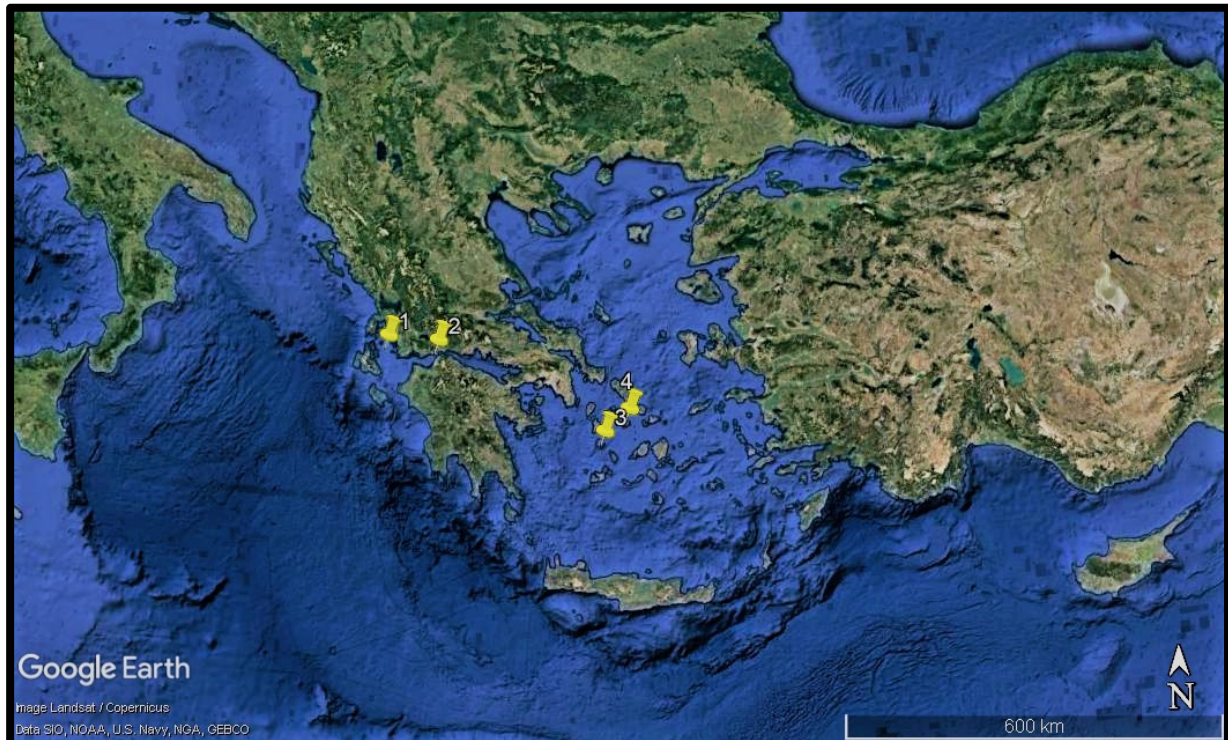
Σκοπός της εργασίας είναι η ανάλυση της υπάρχουσας κατάστασης σε ότι αφορά στην εκτροφή και διασπορά στη φύση, των ειδών του γένους *Pagrus* ή και άλλων αλιευμένων ειδών τα οποία δηλώνονται ή πωλούνται με λάθος τρόπο.

Στην προσπάθεια αυτή γίνεται η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους με μιτοχονδριακούς δείκτες. Πιο συγκεκριμένα με την μέθοδο απομόνωσης DNA με NaCl υψηλής περιεκτικότητας (Aljanabi and Martinez 1997), της αλυσιδωτής αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) (Rodríguez et al. 1991), ενίσχυσης συγκεκριμένου γονιδίου (mtCOI) (Haider et al. 2011), την πέψη του γονιδίου με την μέθοδο πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού και την χρήση περιοριστικών ενζύμων (Tabata and Mizuta 1997), καθώς και την μέθοδο ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (Meyers et al. 1976). Με αυτό τον τρόπο θα εισαχθούν τα αποτελέσματα σε βάση δεδομένων (NCBI), απ' όπου θα γίνει η ταυτοποίηση των ειδών που ερευνώνται.



# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## I. Δειγματοληψίες



**Εικόνα 1.** Τοποθεσίες δειγματοληψίας στα ελληνικά ύδατα και συγκεκριμένα από την περιοχή του Ιονίου Πελάγους (1), την περιοχή της Μακύνειας Αιτωλοακαρνανίας (2), την περιοχή της Σέριφου, νησί των Κυκλάδων στο Αιγαίο Πέλαγος (3), την περιοχή της Σύρου, νησί των Κυκλάδων στο Αιγαίο Πέλαγος καθώς επίσης από έξι ιχθυογεννητικούς σταθμούς, όπως αναλύονται στο κείμενο. Οι ΙΧΣ δεν επιδεικνύονται για λόγους εχεμύθειας. Τα δείγματα των περιοχών 1, 2, 3 και 4 (κίτρινο χρώμα) είναι από ελεύθερους πληθυσμούς.

Έγινε παραλαβή των δειγμάτων στο εργαστήριο μέσω ερευνητών την περίοδο Ιουλίου μέχρι τα μέσα Οκτωβρίου 2018, τοποθετημένων σε Erpendorf των 1,5ml με αιθανόλη 100% (μέσο συντήρησης).

Τα δείγματα αποτελούνταν από κομμάτια του ουραίου πτερυγίου. Αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και αναλύθηκαν σε set των 15 δειγμάτων. Αναλύθηκαν συνολικά 150 δείγματα τα οποία αποτελούνταν από δύο δείγματα από Σέριφο, 33 δείγματα από Ιόνιο, 19 δείγματα από Σύρο, 65 δείγματα από Μακύνεια, καθώς και δείγματα από έξι Ιχθυογεννητικούς Σταθμούς 8 δείγματα από ΙΧΣ1, 2 δείγματα από ΙΧΣ 2, 8 δείγματα από ΙΧΣ3, 3 δείγματα από ΙΧΣ4, 6 δείγματα από ΙΧΣ5, και 5 δείγματα από ΙΧΣ6), Ένα δείγμα από την περιοχή του Ιονίου Πελάγους δεν αναλύθηκε λόγω έλλειψης ιστού.



## II. Απομόνωση DNA με προσθήκη NaCl υψηλής συγκέντρωσης

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου του Aljanabi και Martinez (1997) που χρησιμοποιείται για απομονώσεις DNA και προορίζονται για PCR τεχνικές.

Τοποθετήθηκαν 20mg πτερυγίου σε Eppendorf των 1,5ml για κάθε δείγμα. Με βάση πρωτοκόλλου, προστέθηκαν και αναμείχθηκαν 87,5μl SDS 10%, 700μl extraction buffer (10mM Tris – HCL, 400mM NaCl, 2 mM EDTA, pH = 8,2) και 10μl πρωτεϊνάση K (20mg/ml) για την διάσπαση των μεμβρανών των κυττάρων και των πρωτεϊνών. Τα δείγματα στη συνέχεια επώαστηκαν στους 55 °C έως την επόμενη μέρα. Έπειτα προστέθηκαν 300μl κορεσμένο διάλυμα NaCl 6M και ακολουθήθηκε φυγοκέντρωση. Σε καινούριο Eppendorf των 1,5ml προστέθηκαν 700μl από το υπερκείμενο, 700μl ισοπροπανόλης και φυγοκεντρήθηκαν ώστε να καθιζάνει το DNA. Απομακρύνθηκε το περιεχόμενο προσεκτικά και έγινε προσθήκη αιθανόλης 70%, δύο φορές ώστε να καθαρίσει η πελλέτα DNA από τυχόν προσμίξεις. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και εφόσον στη συνέχεια στεγνώθηκε η πελλέτα DNA στους 37 °C, επαναδιαλύθηκε με 60μl ddH<sub>2</sub>O.

## III. Ενίσχυση τμημάτων μιτοχονδριακού DNA (γονιδίου *mtCOI*) με την χρήση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης – PCR και ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου του Tabata και Mizuta (1997) που χρησιμοποιείται για αναλύσεις *mtDNA* που προορίζονται για πέψη με περιοριστικά ένζυμα (RFLP's).

Η περιοχή του μιτοχονδριακού DNA (γονίδιο *mtCOI*) ενισχύθηκε με την χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Η συγκεκριμένη περιοχή αποτελείται από 704bp. Αναλυτικότερα, ενισχύθηκε με 10μl αντιδραστηρίου το οποίο περιείχε 1μl 10x buffer (100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> / *KAPA Biosystems*), 0,125 μl dNTP's 10mM (*KAPA Biosystems*), 0,5μl Forward primer (*Eurofins / Genomics*) Fish F2 (5'-TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC-3') 10pM (Ward et al 2005), 0,5μl Reverse primer (*Eurofins / Genomics*) Fish R2 (5'-ACT TCA GGG TGA CCG AAG AAT CAG AA-3') 10pM (Ward et al 2005), 0,1μl Taq Πολυμεράσης (*KAPA Biosystems*), 6,775μl ddH<sub>2</sub>O και 1μl DNA σε κάθε δείγμα.

Τοποθετήθηκαν τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή (*Labnet / Multigene*) του εργαστηρίου με τις εξής παραμέτρους: έγινε αποδιάταξη στους 95 °C για δύο λεπτά, υβριδισμός στους 94 °C για 30 δευτερόλεπτα, 52 °C για 30 δευτερόλεπτα και στους 72 °C για ένα λεπτό, (ο υβριδισμός έγινε για 40 κύκλους) και επιμήκυνση στους 72 °C για πέντε λεπτά.

Η οπτικοποίηση των ενισχυμένων PCR – προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση αυτών σε γέλη αγαρόζης 1,5%. Τοποθετήθηκαν τρία μl του PCR – προϊόντος και επτά μl διάλυμα φόρτωσης (loading buffer / *KAPA Biosystems*) στη γέλη για κάθε δείγμα. Χρησιμοποιήθηκε ένα μl Ladder (*Nippon Genetics*) σε κάθε σειρά δειγμάτων, με μοριακό δείκτη 100bp, διαβάθμισης από 100 μέχρι τα 3000 bp. Κάθε γέλη φωτογραφήθηκε με έκθεση σε ακτινοβολία UV (*Syngene / G:Box*).

#### IV. Πέψη PCR – προϊόντων με τα περιοριστικά ένζυμα *TaqI* - *HaeIII* και ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου του Haider et al. (2011) που χρησιμοποιείται για ταυτοποιήσεις ειδών βάσει PCR – RFLP σε μιτοχονδριακό DNA.

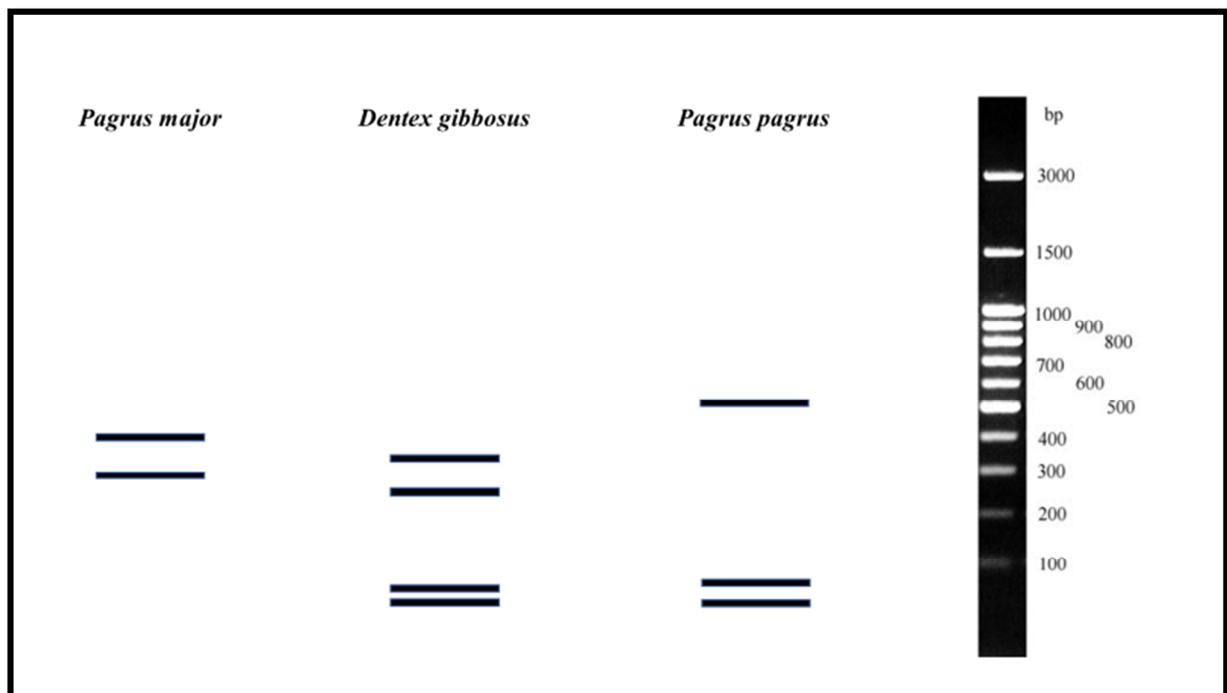
Μετά την ενίσχυση του μιτοχονδριακού τμήματος (γονίδιο *mtCOI*) DNA προσδιορίστηκε στο εργαστήριο με την βοήθεια των ερευνητών, το περιοριστικό ένζυμο *TaqI* και *HaeIII* για την πέψη των δειγμάτων. Τα συγκεκριμένα ένζυμα προσδιορίζονται για ανάλυση του πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού (RFLP). Κάθε πέψη πραγματοποιήθηκε με ένα μl Taq Buffer 10x, ένα μl BSA 0,1%, 0,5μl *TaqI* ή *HaeIII* ένζυμο (*Takara Bio Inc.*) και 7,5μl ddH<sub>2</sub>O μαζί με όλο το PCR-προϊόν του κάθε δείγματος. Η πέψη ολοκληρώθηκε με την χρήση θερμοκυκλοποιητή (*Labnet / Multigene*) τοποθετώντας τα δείγματα στους 65 °C για τρεις ώρες.

Η οπτικοποίηση της πέψης των δειγμάτων έγινε με ηλεκτροφόρηση αυτών σε γέλη αгарόζης 2,5%. Τοποθετήθηκε όλο το προϊόν της πέψης (~18μl) μαζί με 3μl διάλυμα φόρτωσης ( Loading buffer / *KAPA Biosystems*) για κάθε δείγμα. 2μl Ladder (*Nippon Genetics*) με μοριακό δείκτη 100bp, διαβάθμισης από 100 μέχρι τα 3000 bp τοποθετήθηκαν σε κάθε σειρά δειγμάτων της γέλης. Κάθε γέλη φωτογραφήθηκε με έκθεση σε ακτινοβολία UV (*Syngene / G:Box*).

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## I. Βιοπληροφορική Ανάλυση

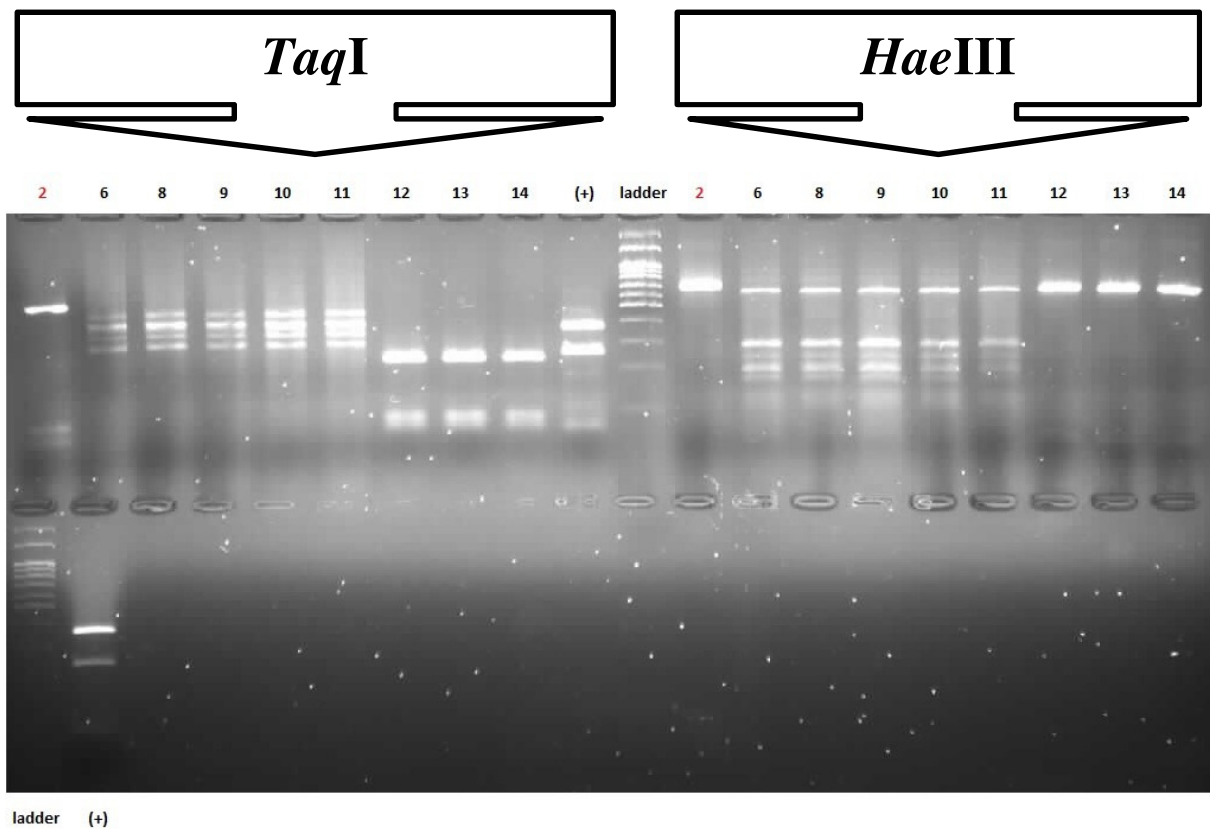
Από την ανάλυση η οποία έγινε από τους Cladas *et al.*, 2019 οι οποίοι χρησιμοποίησαν δεδομένα από την βάση δεδομένων NCBI προέκυψε ότι το γονίδιο COI αναμένεται να δώσει: τα εξής πρότυπα για τα παρακάτω είδη: 548, 87 και 69bp RFLP πρότυπο με την *TaqI* για το είδος φαγκρί *Pagrus pagrus*, στα 310, 260, 73 και 61bp RFLP πρότυπο με την *TaqI* για το είδος φαγκρί *Dentex gibbosus*, στα 404 και 300bp RFLP πρότυπο με την *TaqI* για το είδος φαγκρί *Pagrus major*.



Εικόνα 2. Αναμενόμενα περιοριστικά πρότυπα με τη χρήση ενζύμου *TaqI*.

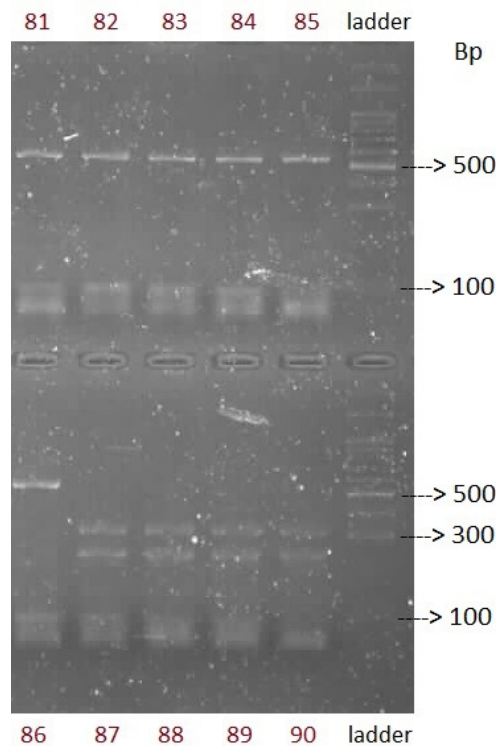
## II. Πολυμορφισμός μήκους θραύσματος περιορισμού (RFLP) σε κάθε δείγμα.

Το μέγεθος των ενισχυμένων με PCR τμημάτων του γονιδίου COI του μιτοχondριακού DNA για το φαγκρί βρίσκεται κατά προσέγγιση στα 704 bp. Τα ενισχυμένα τμήματα και κατ' επέκταση θραύσματα περιορισμού απεικονίζονται στις εικόνες 3 έως 13. Παρατηρήθηκαν θραύσματα περιορισμού των PCR προϊόντων με το ένζυμο περιορισμού *TaqI*, ύστερα από πέψη τους στο εργαστήριο.



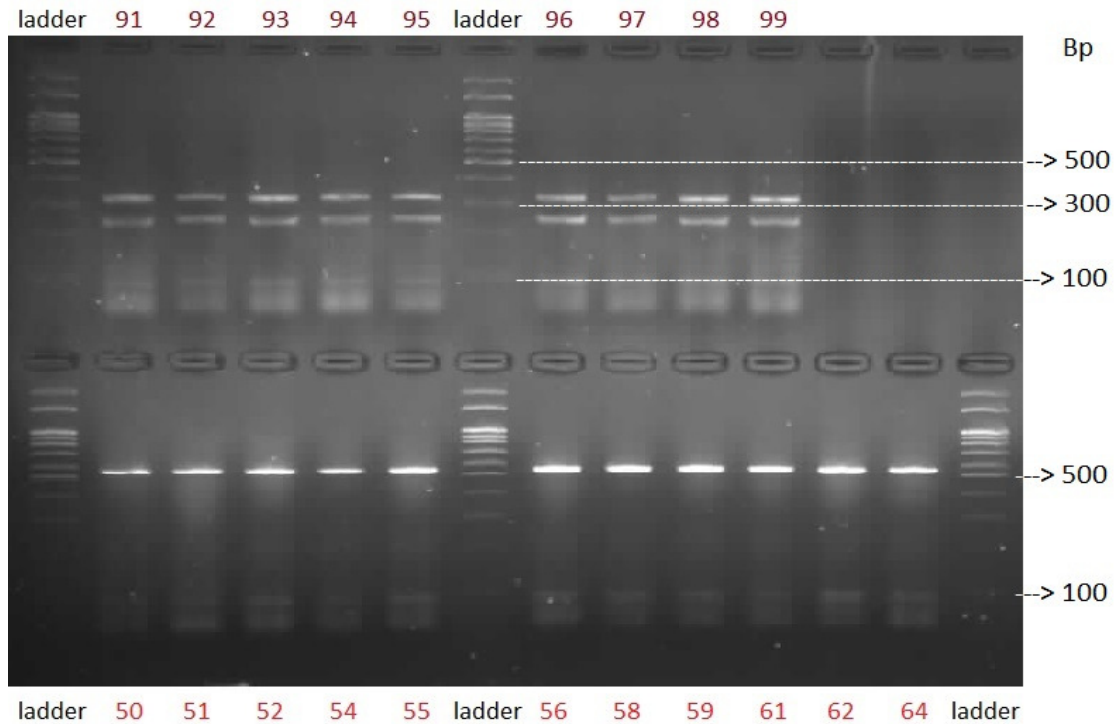
**Εικόνα 3.** Απεικόνιση των ζωνών των ενισχυμένων τμημάτων DNA του γονιδίου COI. Στο επάνω μέρος, στα δείγματα (από αριστερά του Ladder) έχει γίνει πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *TaqI* και στην ίδια σειρά στα δείγματα (από δεξιά του Ladder) έχει γίνει πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *HaeIII*.

Στην **Εικ. 3** παρατηρείται ότι η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *TaqI* λειτουργεί σε όλα τα δείγματα με ευκρίνεια και καθαρότητα, σε αντίθεση με την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *HaeIII*, το οποίο δεν λειτούργησε καλά στα δείγματα 2, 12, 13 και 14. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων αποφασίστηκε η επιλογή του ενζύμου για ολόκληρη την πειραματική διαδικασία.



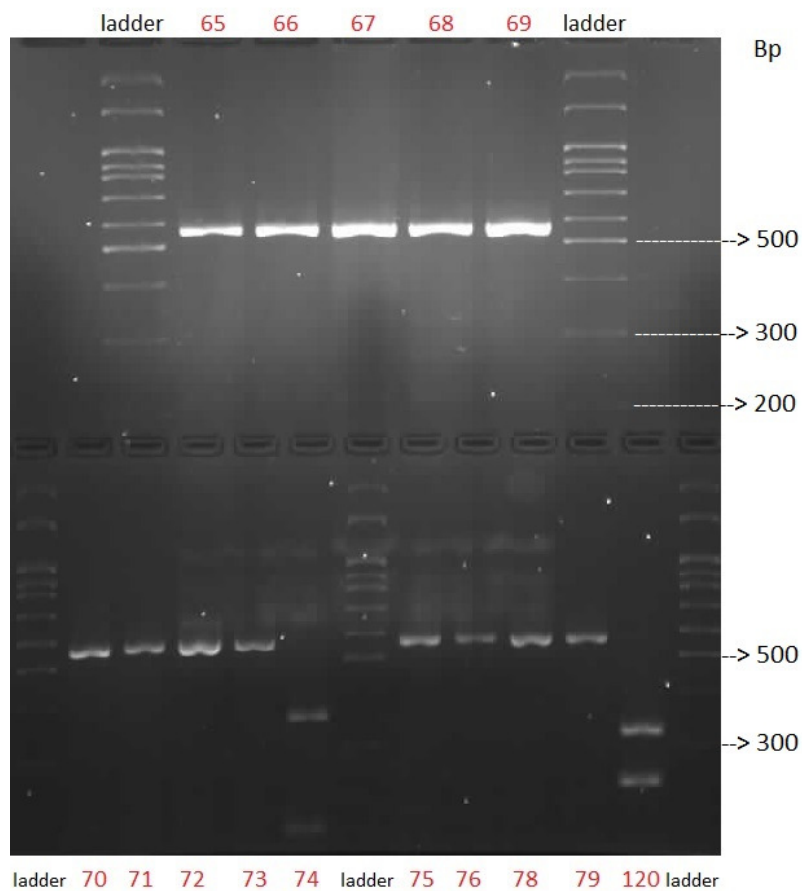
**Εικόνα 4.** Απεικόνιση των ζωνών ενισχυμένων τμημάτων DNA του γονιδίου COI ύστερα από πέψη τους με το περιοριστικό ένζυμο *TaqI*. Όλα τα δείγματα είναι από την περιοχή δειγματοληψίας Σύρος – Κυκλάδες.

Στην **Εικ. 4** τα δείγματα 81 – 86 παρουσιάζουν μεταξύ τους τις ίδιες θέσεις θραυσμάτων περιορισμού (548, 87 και 69bp) και αυτό τα κατατάσσει στο είδος *Pagrus pagrus*. Τα δείγματα 87 – 90 παρουσιάζουν μεταξύ τους τις ίδιες θέσεις θραυσμάτων περιορισμού αλλά, διαφορετικές από τα προηγούμενα δείγματα (310, 260, 71 και 63bp) γεγονός που τα κατατάσσει στο είδος *Dentex gibbosus*. Όλα τα δείγματα της εικόνας προέρχονται από την ίδια περιοχή δειγματοληψίας (Σύρος – Κυκλάδες). Οι Ladder έχουν μοριακό δείκτη 100bp και διαβάθμιση από 100bp – 3000bp ο καθένας.



**Εικόνα 5.** Απεικόνιση των ζωνών ενισχυμένων τμημάτων DNA του γονιδίου COI ύστερα από πέψη τους με το περιοριστικό ένζυμο *TaqI*. Τα δείγματα στο πάνω μέρος της εικόνας προέρχονται από την ίδια περιοχή δειγματοληψίας (Σύρος – Κυκλάδες). Τα δείγματα στο κάτω μέρος της εικόνας είναι από την ίδια μεταξύ τους περιοχή δειγματοληψίας (Íonio Péλαγος).

Στην **Εικ. 5** τα δείγματα 91 – 99 (επάνω μέρος) είναι από την ίδια μεταξύ τους περιοχή δειγματοληψίας (Σύρος – Κυκλάδες) και παρουσιάζουν τις ίδιες θέσεις θραυσμάτων περιορισμού (310, 260, 71 και 63bp) γεγονός που τα κατατάσσει στο είδος *Dentex gibbosus*. Τα δείγματα 50 – 64 (κάτω μέρος) είναι από την ίδια μεταξύ τους περιοχή δειγματοληψίας (Íonio Péλαγος) και παρουσιάζουν τα ίδια θραύσματα περιορισμού (548, 87 και 69bp) γεγονός που τα κατατάσσει στο είδος *Pagrus pagrus*. Τα RFLP πρότυπα φαίνονται έντονα και καθαρά.



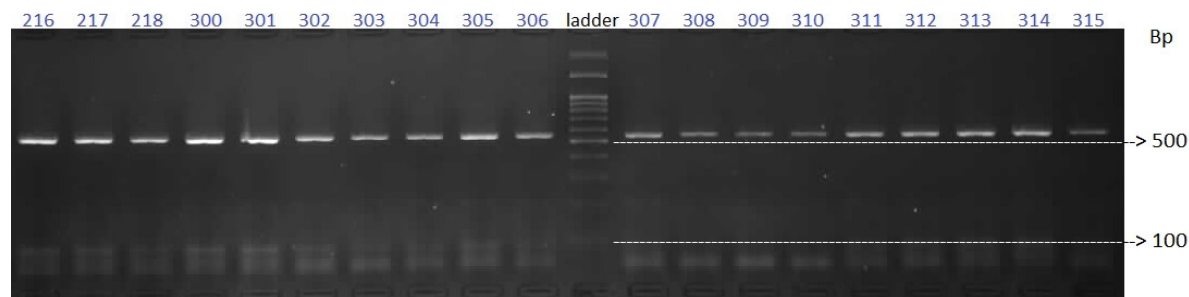
**Εικόνα 6.** Απεικόνιση των ζωνών ενισχυμένων τμημάτων DNA του γονιδίου COI ύστερα από πέψη τους με το περιοριστικό ένζυμο *TaqI*. Τα δείγματα της εικόνας προέρχονται από την ίδια περιοχή δειγματοληψίας (Ιόνιο Πέλαγος).

Στην **Εικ. 6** παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα παρουσιάζουν τις ίδιες θέσεις θραυσμάτων περιορισμού (548, 87 και 69bp) γεγονός που τα κατατάσσει στο είδος *Ragrus ragrus* εκτός, από τα δείγματα 74 και 120 (διαφορετικοί πολυμορφισμοί οι οποίοι θα επαναπροσδιοριστούν λόγω ανεπάρκειας της γέλης). Όλα τα δείγματα ανήκουν στην ίδια περιοχή δειγματοληψίας (Ιόνιο Πέλαγος).



**Εικόνα 7.** Απεικόνιση των ζωνών ενισχυμένων τμημάτων DNA του γονιδίου COI ύστερα από πέψη τους με το περιοριστικό ένζυμο *TaqI*. Τα δείγματα 77 και 130 ανήκουν στην ίδια περιοχή δειγματοληψίας (Ιόνιο Πέλαγος) ενώ τα υπόλοιπα από την ίδια μεταξύ τους περιοχή δειγματοληψίας (Μακύνεια Αιτωλοακαρνανίας).

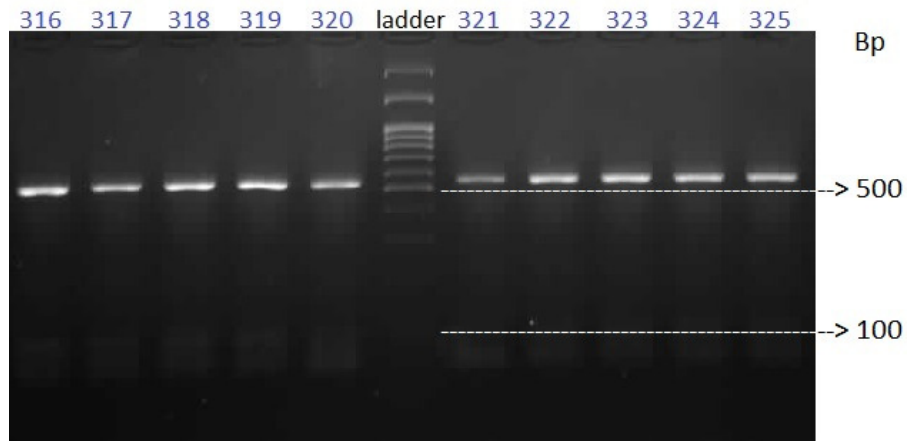
Στην **Εικ. 7** παρατηρείται το ίδιο πρότυπο περιορισμού (548, 87 και 69bp) γεγονός που τα κατατάσσει στο είδος *Pagrus pagrus*. σχεδόν σε όλα τα δείγματα εκτός, από τα δείγματα 135 και 203 τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικό πολυμορφισμό (310, 260, 71 και 63bp) γεγονός που τα κατατάσσει στο είδος *Dentex gibbosus*. Τα δείγματα 77 και 130 είναι από διαφορετική περιοχή δειγματοληψίας (Ιόνιο Πέλαγος) σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα που ανήκουν στην ίδια (Μακύνεια Αιτωλοακαρνανίας).



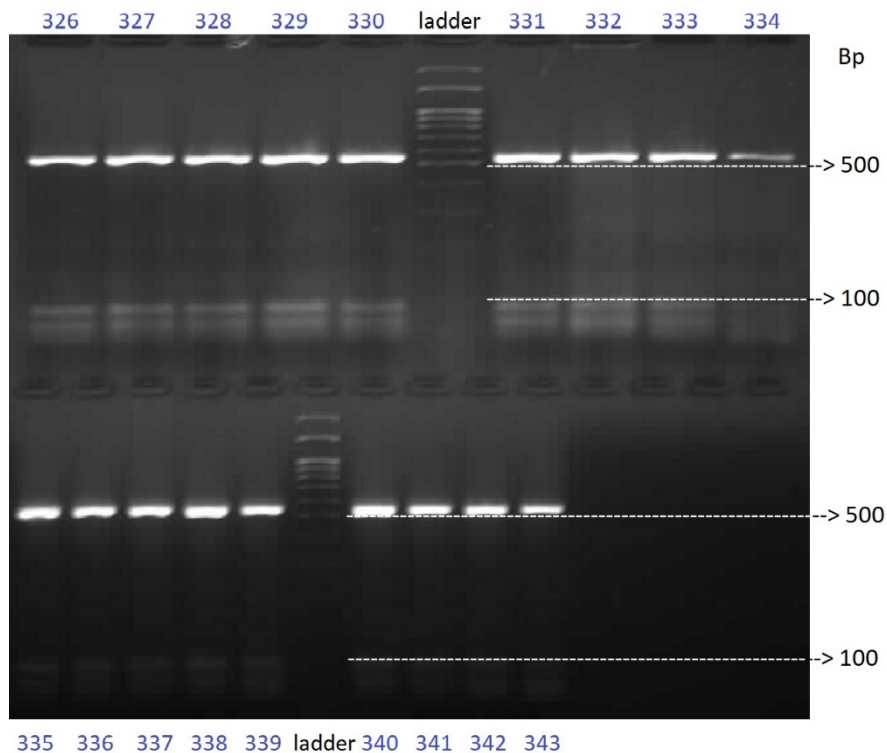
**Εικόνα 8.** Απεικόνιση των ζωνών ενισχυμένων τμημάτων DNA του γονιδίου COI ύστερα από πέψη τους με το περιοριστικό ένζυμο *TaqI*. Όλα τα δείγματα είναι από την ίδια περιοχή δειγματοληψίας (Μακύνεια Αιτωλοακαρνανίας).

Στις **Εικ. 8, 9 και 10** παρατηρείται το ίδιο πρότυπο περιορισμού (548, 87 και 69bp) σε όλα τα δείγματα που προέρχονται από την ίδια περιοχή δειγματοληψίας (Μακύνεια Αιτωλοακαρνανίας) γεγονός που τα κατατάσσει στο είδος *Pagrus pagrus*. Τα RFLP πρότυπα φαίνονται έντονα και καθαρά.

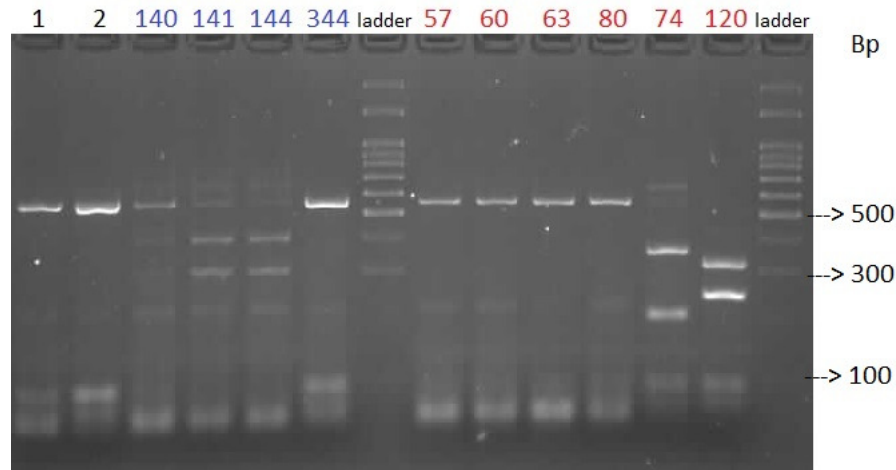




**Εικόνα 9.** Απεικόνιση των ζωνών ενισχυμένων τμημάτων DNA του γονιδίου COI ύστερα από πέψη τους με το περιοριστικό ένζυμο *TaqI*. Τα δείγματα ανήκουν στην ίδια περιοχή δειγματοληψίας (Μακύνεια Αιτωλοακαρνανίας).

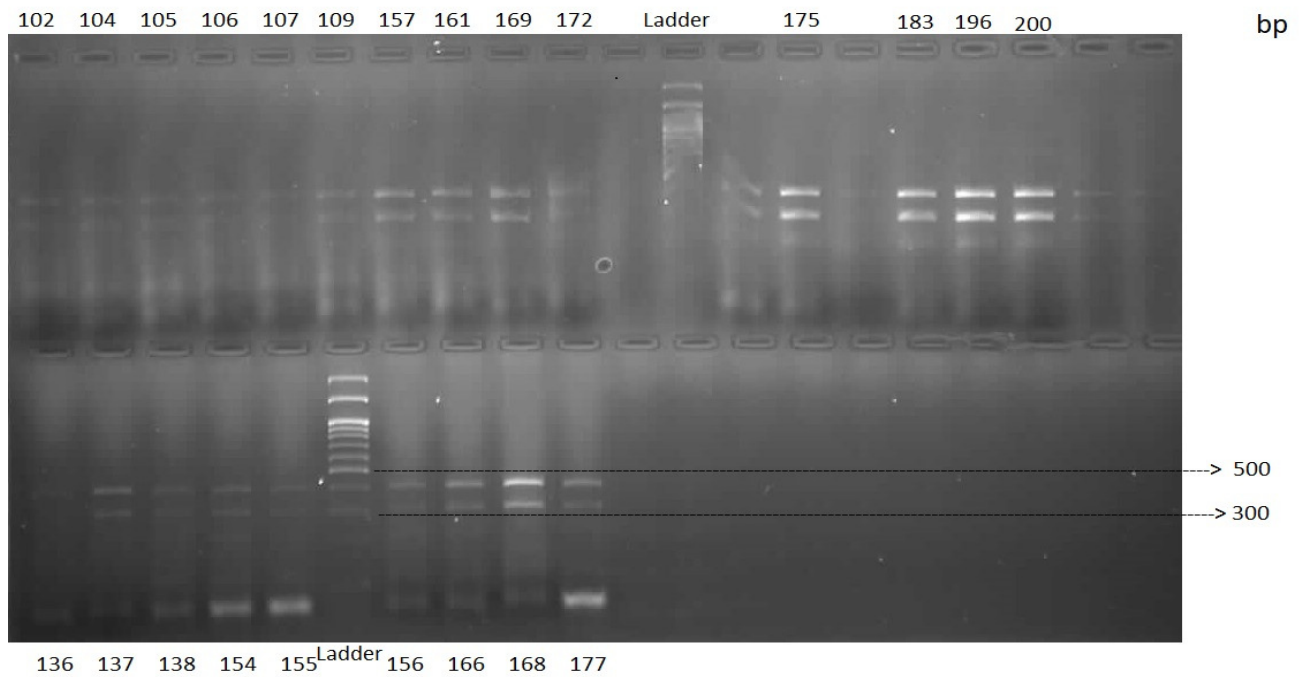


**Εικόνα 10.** Απεικόνιση των ζωνών ενισχυμένων τμημάτων DNA του γονιδίου COI ύστερα από πέψη τους με το περιοριστικό ένζυμο *TaqI*. Όλα τα δείγματα ανήκουν στην ίδια περιοχή δειγματοληψίας (Μακύνεια Αιτωλοακαρνανίας).



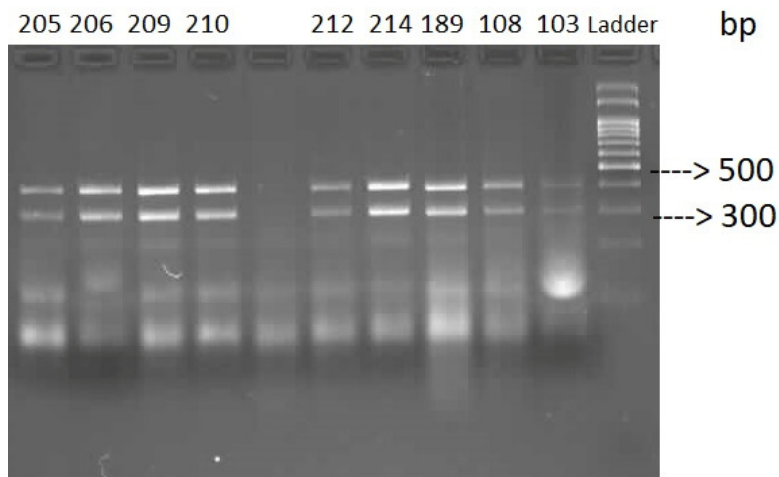
**Εικόνα 11.** Απεικόνιση των ζωνών ενισχυμένων τμημάτων DNA του γονιδίου COI ύστερα από πέψη τους με το περιοριστικό ένζυμο *TaqI*. Τα δείγματα 1 και 2 προέρχονται από την ίδια περιοχή δειγματοληψίας (Σέριφος – Κυκλάδες), τα δείγματα 140, 141, 144 και 344 από την ίδια μεταξύ τους περιοχή δειγματοληψίας (Μακύνεια Αιτωλοακαρνανίας) ενώ, τα δείγματα 57, 60, 63, 80, 74 και 120 ανήκουν στην ίδια μεταξύ τους περιοχή δειγματοληψίας (Ιόνιο Πέλαγος).

Στην **Εικ. 11** παρατηρείται ότι τα δείγματα 1, 2, 344, 57, 60, 63 και 80 παρουσιάζουν το ίδιο πρότυπο περιορισμού (548, 87 και 69bp) γεγονός που τα κατατάσσει στο είδος *Pagrus pagrus*. Το δείγμα 140 δεν παρουσιάζει ξεκάθαρα θραύσματα περιορισμού. Τα δείγματα 141 και 144 παρουσιάζουν μεταξύ τους το ίδιο πρότυπο περιορισμού (404, 300bp) γεγονός που τα κατατάσσει στο είδος *Pagrus major*. Στα δείγματα 74 και 120 έγινε επανάληψη της πέψης με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο (*TaqI*), όπου παρουσιάζεται το διαφορετικό πρότυπο περιορισμού μεταξύ τους πιο ξεκάθαρα (το 74 δείγμα δεν προσδιορίστηκε στο εργαστήριο). Το δείγμα 120 αντιστοιχεί στα 310, 260, 71 και 63bp γεγονός που το κατατάσσει στο είδος *Dentex gibbosus*.



**Εικόνα 12.** Απεικόνιση των ζωνών ενισχυμένων τμημάτων DNA του γονιδίου COI ύστερα από πέψη τους με το περιοριστικό ένζυμο *TaqI*.

Στην **Εικ. 12** παρατηρείται ότι τα δείγματα (από αριστερά των Ladder στο πάνω και κάτω μέρος της εικόνας) έχουν παρουσιάσει δυσλειτουργία κατά την πέψη, εκτός από τα δείγματα 157, 161, 169, 137 και 154 στα οποία φαίνονται τα θραύσματα περιορισμού (404, 300bp) γεγονός που τα κατατάσσει στο είδος *Pagrus major*. Στα δείγματα (δεξιά των Ladder) 175, 183, 196, 200 και 168 φαίνεται έντονα και καθαρά το ίδιο πρότυπο περιορισμού (404, 300bp) γεγονός που τα κατατάσσει στο είδος *Pagrus major*.



**Εικόνα 13.** Απεικόνιση των ζωνών ενισχυμένων τμημάτων DNA του γονιδίου COI ύστερα από πέψη τους με το περιοριστικό ένζυμο *TaqI*.

Στην **Εικ. 13** παρατηρείται ότι το πρότυπο περιορισμού (404, 300bp) φαίνεται έντονα και καθαρά στα δείγματα, εκτός από τα δείγματα 108 και 103 γεγονός που τα κατατάσσει στο είδος *Pagrus major*. Ο Ladder έχει μοριακό δείκτη 100bp διαβάθμισης από 100 – 3000bp.

**Πίνακας 1.** Σύνοψη αποτελεσμάτων RFLP ανάλυσης ατόμων φυσικών πληθυσμών τα οποία δηλώνονται ως «φαγκρί»

Τοποθεσία	Είδος	Αριθμός	Συχνότητα εμφάνισης/ τοποθεσία	Συνολική Συχνότητα
Σέριφος	<i>Pagrus pagrus</i>	2	100%	1.7%
Σύρος	<i>Pagrus pagrus</i>	6	31,6%	5.1%
	<i>Dentex gibbosus</i>	13	68,4%	11.0%
Ιόνιο Πέλαγος	<i>Pagrus pagrus</i>	31	94%	26.3%
	<i>Dentex gibbosus</i>	1	3%	0.8%
Μακύνεια	<i>Pagrus pagrus</i>	60	92,3%	50.8%
	<i>Dentex gibbosus</i>	2	3%	1.7%
	<i>Pagrus major</i>	3	4,6%	2.5%
ΣΥΝΟΛΟ		118		100%

**Πίνακας 2.** Σύνοψη αποτελεσμάτων RFLP ανάλυσης ατόμων εκτρεφόμενων πληθυσμών

Τοποθεσία	Είδος	Αριθμός
ΙΧΣ1	<i>Pagrus major</i>	7
ΙΧΣ2	<i>Pagrus major</i>	1
ΙΧΣ3	<i>Pagrus major</i>	1
ΙΧΣ4	<i>Pagrus major</i>	1
ΙΧΣ5	<i>Pagrus major</i>	6
ΙΧΣ6	<i>Pagrus major</i>	4
ΣΥΝΟΛΟ		20

Αναλυτικά, ταυτοποιήθηκαν 99 δείγματα ως το είδος φαγκρί *Pagrus pagrus*, 16 δείγματα ως το είδος φαγκρί *Dentex gibbosus*, 23 δείγματα ως το είδος φαγκρί *Pagrus major* ενώ, ένα δείγμα (δείγμα 74) δεν προσδιορίστηκε στο εργαστήριο αλλά, χαρακτηρίστηκε ως ένας διαφορετικός πολυμορφισμός του είδους *Pagrus pagrus*.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πρωτόκολλο PCR – RFLP αποτελεί μια επαναλαμβανόμενη αλλά και αξιόπιστη τεχνική (Haider 2003) από την αλληλούχηση DNA. Είναι φθηνότερη, ευκολότερη, απλούστερη και ταχύτερη τεχνική. Απαιτεί υλικά και εξοπλισμό που υπάρχουν στα περισσότερα βιοτεχνολογικά εργαστήρια και επιπλέον απαιτεί μικρή ποσότητα DNA (Graner et al. 1999).

Η PCR παράγαγε ενισχυμένα τμήματα του μιτοχονδριακού γονιδίου COI στις 704bp. Για την ανάλυση των προφίλ περιορισμού λήφθηκαν υπόψιν οι έντονες και πιο ευκρινείς ζώνες όπως αποτυπώθηκαν πάνω στην γέλη αγαρόζης. Γενικά, τα προφίλ περιορισμού που δημιουργήθηκαν σε αυτή την μελέτη είχαν ξεχωριστά θραύσματα επιτρέποντας την εύκολη και ξεκάθαρη ερμηνεία των αποτελεσμάτων περιορισμού. Το περιοριστικό ένζυμο *TaqI* ήταν επαρκές για να ξεχωρίσει όλα τα δείγματα.

Εμείς αναγνωρίσαμε ότι μεταξύ των ατόμων των φυσικών πληθυσμών καταγράφονται 99 άτομα του είδους *Pagrus pagrus* και 16 του είδους *Dentex gibbosus*. Επίσης, ανιχνεύθηκαν και 3 άτομα του είδους *Pagrus major*. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα των Cladas et al., οι οποίοι αναγνώρισαν άτομα του είδους στο φυσικό περιβάλλον. Σημαντικό εύρημα είναι ότι όλα τα άτομα που αναλύθηκαν από τους Ιχθυογεννητικούς σταθμούς ανήκουν στο είδος *Pagrus major*.

Από τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι διαφορετικά είδη που δεν ανήκουν καν στο ίδιο γένος εμπορεύονται ως «φαγκρί». Αυτά τα είδη είναι τα: *Pagrus pagrus*, *Dentex gibbosus* και *Pagrus major*. Τα παραπάνω είδη ανιχνεύθηκαν σε ποσοστά 83,9%, 13,5% και 2,5% αντίστοιχα. Σημαντικό εύρημα είναι ότι τόσο στη Σύρο όσο και στο Ιόνιο, οι «ψαριές» ήταν μικτές και αποτελούνταν τόσο από *Pagrus pagrus* (31,4%) όσο και *Dentex gibbosus* (11,8%). Αυτό δείχνει ότι στην αλιεία είναι σημαντικό το ποσοστό της λανθασμένης σήμανσης των αλιευμάτων και η εσκεμμένη ή μη παραπλάνηση του καταναλωτή. Αυτό είναι ένα πρόβλημα γνωστό παγκοσμίως.

Παρ' όλα αυτά η ανιχνευσιμότητα μπορεί να βελτιώσει τη διαχείριση των σχετικών κινδύνων στην ασφάλεια των ψαριών, καθώς και στην εξασφάλιση της γνησιότητας των προϊόντων, την παροχή αξιόπιστων πληροφοριών στους πελάτες, την ενίσχυση της διαχείρισης της προσφοράς και τη βελτίωση της ποιότητας και της βιωσιμότητας των προϊόντων (Di Pinto et al. 2015).

Σαν γεγονός, η εισαγωγή μη γηγενών ειδών έχει δημιουργήσει ως ένα βαθμό πρόβλημα στην απώλεια οικοτόπων και στον διαχωρισμό του τοπίου χωροκατακτητικά αποτελώντας απειλή της παγκόσμιας βιοποικιλότητας (Walker & Steffen 1997). Οι οικονομικές επιπτώσεις των ειδών αυτών καθώς και η περιβαλλοντική ζημιά που προκαλούν έχουν κύρια σημασία διεθνώς (Pimentel et al. 2000). Η διαχείριση και ο έλεγχος των μη γηγενών ειδών είναι ίσως η μεγαλύτερη δοκιμασία όπου η προστασία των βιολόγων παγκοσμίως θα κληθεί να αντιμετωπίσει τις επόμενες δεκαετίες (Allendorf & Lundquist 2003). Το εάν θα υπάρξει αποτελεσματική διασπορά (όταν δηλαδή τα άτομα που απελευθερώθηκαν στη φύση καταφέρουν να μεταφέρουν και να κληρονομηθούν τα γονίδια τους) ή μη αποτελεσματική διασπορά (όταν δηλαδή ο παράγοντας διασποράς μετακινείται σε άλλο βιότοπο ανεξάρτητα από αν αναπαράγει με επιτυχία και μεταδίδει τους γαμέτες) (Cayuela et al. 2018), είναι αντικείμενο περαιτέρω μελέτης για τα επόμενα χρόνια.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aljanabi S.M. and Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. Vol. 25, No. 22 Pages: 4692 – 4693
- Arber W. 1965. “Host-controlled modification of bacteriophage,” *Annu. Rev. Microbiol.*, Pages: 365-378
- Allendorf Fred W. and Lundquist Laura L. 2003. Introduction: Population Biology, Evolution, and Control of Invasive Species. Pages: 24 – 30
- Cladas Y., Spala K., Doudoumis V., Ketsilis-Rinis V., Batargias C. and Koutsikopoulos C. 2019. Presence Confirmation of Non-Native Species *Pagrus major* (Temminck And Schlegel, 1843) in the Eastern Mediterranean Pages: 1 - 2
- Cayuuela H., Rougemont Q., Prunier J.G., Moore J.S., Clobert J., Besnard A. and Bernatchez L. 2018. Demographic and genetic approaches to study dispersal in wild animal populations: A methodological review. Pages: 1 – 35
- Di Pinto A., Marchetti P., Mottola A., Bozzo G., Bonerba E., Ceci E., Bottaro M. and Tantillo G. 2015. Species identification in fish fillet products using DNA barcoding. Pages: 9 – 13.
- Dulcic J. and Kraljevic M. 2007. On the record of red seabream *Pagrus major* (Temminck and Schlegel, 1843) (Osteichthyes: Sparidae) in the Adriatic Sea. *Scientia Marina* 71(1): 15-17.
- Foscarini R. 1988. A Review: Intensive Farming Procedure for Red Sea Bream (*Pagrus major*) in Japan. *Aquaculture* 72(3-4): 191-246.
- Girish P.S., Anjaneyulu A.S.R., Viswas K.N., Shivakumar B.M., Anand M., Patel M. et al. 2005. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*, 70 Pages: 107–112
- Graner A., Streng S., Kellermann A., Schiemann A., Bauer E., Waugh R. et al. 1999. Molecular mapping and genetic fine-structure of the rym5 locus encoding resistance to different strains of the Barley Yellow Mosaic Virus Complex. Pages: 285–290.
- Haider N. 2003. Development and use of universal primers in plants. PhD thesis.
- Haider N., Nabulsi I. and Al-Safadi B. 2011. Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene. Pages: 1 - 4
- Hartwell L.H., Hood L., Goldberg M.L., Reynolds A.E., Silver L.M. 2011. *Genetics: From Genes to Genomes*. 4<sup>th</sup> edition: 613 – 620
- Hebert P.D.N., deWaard J.R. and Landry J.F. 2010. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology Letters*, 6. Pages: 359–362.
- Καρκαλούσος Π. 2012. Αρχές Ηλεκτροφόρησης. 1η έκδοση
- Kesmen Z., Yetim H. and Şahin F. 2010. Identification of different meat species used in sucuk production by PCR assay. *GIDA*, 35(2). Pages: 81–87.
- Kocher T.D., Conroy J.A., McKaye K.R., Stauffer J.R. and Lockwood S.F. 1995. Evolution of the ND2 gene in East African cichlids. *Mol. Phylogenet. Evol.* Pages: 420 – 432
- Kurihara A., Tawata M., Ikegishi Y., Aida K. and Onaya T. 1999. The procedure of polymerase chain reaction – restriction fragment – single strand conformation polymorphism analysis by *HhaI/HincII* to detect mitochondrial DNA mutations. *Life Sciences*, 64, Pages: 1223–1230
- Li Y., Dark J.S., Deng J.H. and Bai Y. 2006. Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *Journal Bioenerg Biomembr.*
- Mafu A.A., Pitre M. and Sirois S. 2009. Real-time PCR as a tool for detection of pathogenic bacteria on contaminated food contact surfaces by using a single enrichment medium. *Journal of Food Protection*, 72(6). Pages: 1310–1314.



- Meyers A.J., Sanchez D., Elwell P.L. and Falkow S. 1976. Simple Agarose Gel Electrophoretic Method for the Identification and Characterization of Plasmid Deoxyribonucleic Acid. *Journal of Bacteriology*. Pages: 1529 – 1537
- Nakabo T. 2002. Fishes of Japan with pictorial keys to the species. In: English edition I, Tokai University Press, Japan, pp. 866
- Pfaffl Michael W. 2004. «Quantification strategies in real-time PCR», from A-Z of quantitative PCR Pages: 87 – 112.
- Pimentel D., Lach L., Zuniga R. and Morrison D. 2000. Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States. *BioScience* 50. Pages: 53 - 65.
- Rodriguez M.A., Gracia T., Gonzalez I., Asensio L., Fernandez A. and Lobo E. 1991. Identification of goose (*Anser*) and mule duck (*Anas platyrhynchos* x *Carina moschata*) foegras by multiplex polymerase chain reaction amplification of the 5S rDNA gene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Pages: 2717–2721.
- Tabata K. and Mizuta A. 1997. RFLP Analysis of the mtDNA D-loop Region in Red Sea Bream *Pagrus major*. Population from Four Locations of Western Japan. Pages: 211 – 217
- Walker B. and Steffen W. 1997. An overview of the implications of global change for natural and managed terrestrial ecosystems.
- Wang Q., Zhang X., Zhang H.Y., Zhang J., Chen G.Q., Zhao D.H., et al. 2010. Identification of 12 animal species meat by T-RFLP on the 12S rRNA gene. *Meat Science*, 85(2). Pages: 265–269.
- Ward R., Zemlak T., Innes B., Last P. and Hebert P. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Pages: 1847 – 1857
- Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M., George M.Jr., Gyllensten U.B., Helm-Bychowski K. M., Higuchi R.G., Palumbi S.R., Prager E.M. Sage R.D. and Stoneking M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Pages: 375 - 400